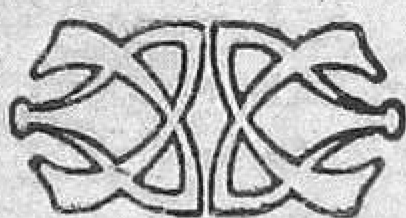
Estratto Bollettino Società Eustachiana
Anno XIX - N. IV-VI - 1921

Al Chiar. Prof. Sen. Foà
rispettoso omaggio
G. Dagata
Camerino 1-V-1922

398

Prof. G. D' AGATA

CONTRIBUTO allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melano-sarcomi

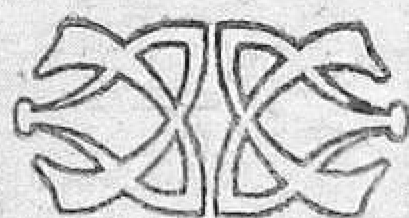


CAMERINO TIP. MERCURI - MICONI

Istituto di Patologia e Clinica Chirurgica dell' Universitá di Camerino

Prof. G. D' AGATA

CONTRIBUTO
allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melano-sarcomi



CAMERINO TIP. MERCURI - MICONI

Istituto di Patologia e Clinica Chirurgica dell'Università di Camerino

Prof. G. D'AGATA

Contributo allo studio isto-bio-chimico sul pigmento dei melano-sarcomi (1)

Il problema sulla natura ed origine del pigmento nei tumori melanotici ha dato luogo a molte discussioni e controversie.

Il dibattito per lungo tempo è stato principalmente imperniato sulla questione della pretesa sua derivazione da trasformazione del pigmento ematico; e per questo si tenevano in gran conto le analisi chimiche e le ricerche sulla presenza o mancanza del ferro.

Così analizzando chimicamente dei tumori melanotici alcuni autori hanno affermato di avere potuto mettere in evidenza una certa percentuale di ferro (analisi di *Dressler*, *Mörner*, *Lo Cascio*, *Braude* e *Pfeiffer*, *Schmiedeberg*); mentre al contrario altri ne escludono la presenza o ne ammettono tracce minime, che vengono attribuite ad impurità e quindi da trascurare nella valutazione dei fatti per ammetterne la genesi dall'ematina (analisi di *Heintz*, *Berdez* e *Nencky*, *v. Fürth*, *Salkowski*).

---

(1) I preparati istologici sono stati presentati alla Società Eustachiana di Camerino nell' adunanza del 7 dicembre 1921.

Di pari passo alle sopradette ricerche chimiche sono andate alcune ricerche microscopiche, le quali si proponevano di ricercare il ferro sulle sezioni istologiche, ottenute a mezzo del microtomo congelatore, cimentandole con speciali reazioni, quali il metodo di *Perls*, di *Sneider*, e quello di *Quincke*. Con tale espediente di tecnica hanno ottenuto risultati negativi ***Carbone***, *Lagrange*, *Vallillo*, *Licini*, *Pereyra*, ***Razzaboni***. È da notare, però, come alcuni autori, come ***Neumann***, ***Schmorl*** e *v. Kahlden* avevano già espresso il parere sulla poca attendibilità del risultato negativo in queste ricerche per negare l' esistenza del ferro, potendo questo trovarsi nel tessuto in combinazione tale, per cui le reazioni possono non aver luogo.

A questi studi chimici e istologici sulla natura del pigmento dei tumori melanotici, vanno intimamente legati altri studî sull'origine di esso, ammettendo alcuni studiosi che questo abbia origine dall'esterno dell'elemento cellulare, e in esso pervenga per un processo di infiltrazione; mentre una schiera di osservatori è dell'avviso che il pigmento melanico delle cellule neoplastiche abbia origine endogena e che quindi venga elaborato in sito per una speciale attività cellulare.

Studi moderni tenderebbero sopratutto a precisare l' origine delle melanine delle cellule neoplastiche come derivati da disintegrazione della molecola proteica. A questi risultati hanno moltisssimo contribuito una interessante serie di ricerche, comprovanti come le melanine naturali (da considerare probabilmente come simili alle melanine dei tumori melanotici) derivino da ossidazione e condensazione di composti a struttura ciclica delle proteine. (Per i corpi melanoidinici vedi ri-

cerche di *Ducceschi*, di *Schmiedeberg;* per le melanine naturali, ric. di v. *Fuerth*, *Neuberg*, *Meyrowschy*, *Samuely*, *Durham*).

Quali corpi ciclici da considerare come melanogeni per la maggioranza dei sopradetti autori è da attribuire valore a corpi a struttura essenzialmente fenolica, del tipo della tirosina, che trovasi quasi sempre quale costituente delle proteine. Tale sostanza, secondo v. *Fürth* e *Schneider* si renderebbe libera per disintegrazione proteica e poi si trasformerebbe in melanina per azione di alcuni fermenti ossidanti, quali la tirosinasi.

Secondo più recenti concetti, basati su numerosi dati di fatto, le melanine avrebbero origine dalla condensazione e ossidazione di nuclei pirrolici, che, come è noto, si trovano tanto diffusi in natura, quali costituenti delle proteine (concezione di *Angeli*); e nelle sedute precedenti di questa Società Eustachiana abbiamo assistito allo svolgersi di tali nuove concezioni con ben condotte ricerche di biochimica, per opera del prof. *Saccardi* della nostra Università.

Suggestivi per il nostro argomento sono i risultati comunicati dal *Saccardi* e dal *Rondoni*, i quali affermano di aver ottenuto dell'imbrunimento cutaneo (molto evidente a carico dei bulbi piliferi), se si iniettano ripetutamente sottocute del pirrolo o altri suoi derivati, a conigli, a pelame scuro, specialmente se questi animali vengono tenuti alla luce.

* * *

Essendo venuto alla mia osservazione, in Clinica, un caso di melanosarcoma della cute, volli intrapren-

dere delle ricerche isto-bio-chimiche, allo scopo di portare un contributo sull' argomento, tenendo presenti le moderne vedute sulla genesi delle melanine da composti pirrolici.

Si trattava di un uomo di 37 anni, che nel gennaio 1917, trovandosi sotto le armi, vide sorgere a carico di un neo pigmentato della cute, situato a livello del malleolo interno, in vicinanza della regione calcaneare sinistra, una neoformazione che fu diagnosticata come sarcoma melanotico. Ricoverato in un Ospedale militare, nel settembre dello stesso anno, fu chirurgicamente asportato il tumore allorchè aveva assunto la grossezza di un uovo di piccione. Afferma di non aver avvertito alcun disturbo, nè di aver notato altra neoformazione, fino al marzo 1918, allorchè si accorse di una tumefazione indolente alla regione inguino-crurale dello stesso lato. Per tale affezione chirurgica chiese ospitalità, nel giugno 1919, alla Clinica Chirurgica di Camerino e fu operato dal prof. *Razzaboni* di asportazione della massa neoplastica della grandezza di una grossa arancia, dalla regione inguino-crurale, assieme ad altri gangli linfatici della parte, poco invasi dal processo blastomatoso

Essendo state notate altre tumefazioni nella regione iliaca interna sinistra fu praticata una *toelette* della regione, la quale riuscì abbastanza laboriosa, avendo parte della formazione neoplastica assunti intimi rapporti con i vasi iliaci.

Il prof. *Saccardi* procedette a ricerche chimiche su pezzi di tumore (che presentava istologicamente la struttura di un sarcoma polimorfo-cellulare melanotico), appena escisso operatoriamente, ottenendo delle mela-

nine, che presentavano gli stessi caratteri delle melanine naturali e del nero di pirrolo.

Dopo alcun tempo dal secondo intervento chirurgico, si notò riproduzione in sito della neoplasia nella regione inguino-crurale, con invasione nella regione soprapubica: neoformazioni, poco o nulla macroscopicamente pigmentate, che raggiungendo il volume di una grossa arancia, cominciarono a ulcerarsi. Intanto anche in corrispondenza del malleolo interno, dove era sorta tre anni avanti la prima formazione neoplastica, a carattere melanotico (neoplasia chirurgicamente asportata nel settembre 1917), si notò di nuovo la comparsa di una piccola tumefazione, non pigmentata, spostabile sulla pelle soprastante, di colorito normale. Un' altra tumefazione con gli stessi caratteri si presentò sulla parte antero-esterna della gamba sinistra, nel suo terzo medio.

A questo periodo, ripetutamente esaminate le urine di questo paziente con le diverse reazioni, per svelare la presenza di melanogeno, si ebbe risultato incerto con la reazione del *Thormählen* e anello lievemente bruno con l' acido nitrico.

Durante la degenza in Clinica volli iniettare in seno alla compagine del nodulo neoplastico, situato nel 3.° medio della gamba sinistra, c. c. 2 di una soluzione debolmente alcalina di pirrolo all' 1 °/₀ (gentilmente favoritami dal prof. *Saccardi*); che ripetei per 4 volte con l' intervallo da 3 a 4 giorni. Queste iniezioni riuscirono indolori e non diedero il benchè minimo disturbo, come aveva precedentemente notato il *Saccardi*. Le urine del paziente analizzate diedero luogo a fugace e debole reazione col *Thormählen* e formazione di anello bruno con l' *Heller*, dalla 16.ª alla 50.ª ora.

Già alcuni giorni dopo dalla seconda iniezione di pirrolo la massa neoplastica pirrolizzata faceva notare attraverso la cute normale un certo imbrunimento, che divenne ulteriormente più intenso; mentre l' altro nodulo della regione malleolare, iniettato con la stessa quantità di soluzione fisiologica, si manteneva non pigmentato. Tre giorni dopo dall' ultima iniezione, escissi il nodulo neoplastico pirrolizzato e quello non pigmentato, sottoponendo all' esame microscopico dei pezzi, tagliati al microtomo congelatore e montati in glicerina. In tutti e due i pezzi era architettonicamente evidente la struttura sarcomatosa, per lo più a cellule polimorfe, in alcuni punti a cellule fusate; mentre però quello pirrolizzato mostrava chiaramente la maggior parte delle sue cellule infarcite di granuli di pigmento di color giallo-brunastro o marrone più o meno scuro, quell' altro se ne mostrava sprovvisto o faceva notare nell' interno dei suoi elementi cellulari delle scarse granulazioni, come vescicole di color gialletto. Nel nodulo pigmentato erano riconoscibili a più forte ingrandimento, in mezzo a cellule infarcite talmente da esserne completamente mascherate da granuli di pigmento, delle cellule meno cariche o quasi prive di granulazioni melaniche. Questi ultimi elementi cellulari si presentavano di minor grandezza di quelli fortemente pigmentati, mostrando distintamente il loro nucleo.

Da questi esperimenti (che trovano riscontro in quelli sopra ricordati di *Saccardi* e *Rondoni*, i quali hanno ottenuto aumento di fabbricazione di melanine da parte di cellule di matrice del pelo con iniezioni di composti pirrolici nel sottocutaneo di conigli) possiamo affermare che l' iniezione di pirrolo, praticata nella com-

pagine di un nodulo metastatico sarcomatoso, non pigmentato (proveniente da un melano-sarcoma cutaneo), è stato capace di provocare, attivando, la formazione di prodotti melanici, da parte di cellule neoplastiche melanogene, ossidazione prodottasi verosimilmente per opera di speciali fermenti (dopa - ossidasi sec. *Bloch*; pirrolo-ossidasi sec. *Rondoni*).

* * *

Allo scopo di poter meglio stabilire la natura delle granulazioni di pigmento, rilevate nel parenchima del nodulo neoplastico pirrolizzato, ho voluto sottoporre sezioni di questo a varie reazioni isto - chimiche, mettendo in confronto tali risultati con quelli ottenuti su sezioni di pezzi del tumore melanotico, estirpato alcuni anni prima e conservato in soluzione di formalina al 10 %.

Adoperando su sezioni, ottenute al microtomo congelatore, il metodo di *Perls-Seneider* per la ricerca del ferro (ferrocianuro di potassio e acido cloridrico) ebbi risultato negativo. Così pure usando il metodo *Unna* alla fuxina e differenziazione in acido tannico per mettere in evidenza i pigmenti ematici.

Col bleu di metilene policromo, invece, raccomandato dallo stesso *Unna* come reattivo istologico per le melanine, ebbi a notare come le granulazioni di pigmento assumano una tinta verde-smeraldo o verde-erba più o meno scura; e ciò avveniva tanto nelle sezioni dei pezzi tratti dal tumore naturalmente melanotico, quanto nelle sezioni del nodulo divenuto pigmentato in vivo con l' artificio sopra indicato.

***

Avendo precedenti autori (*Cipollone*, *Pereyra*, *Bilancioni*) asserito che col metodo *Alfieri* al permanganato potassico e successiva azione dell' acido ossalico si riesce a poter decolorare (completamente secondo *Pereyra*, parzialmente secondo *Bilancioni*) le granulazioni di pigmento, riscontrato in vari tumori melanotici dell'uomo, volli provare tale modalità di tecnica per decolorare sezioni istologiche, tagliate al microtomo congelatore, tanto di pezzi di tumore naturalmente melanotico, quanto del nodulo metastatico divenuto pigmentato con ripetute iniezioni di pirrolo.

Facendo agire il permanganato di potassio, per circa 5'-10', ottenni la decolorazione di quasi tutte le granulazioni di pigmento, di color marrone o giallo-brunastro; tranne alcune poche granulazioni nere, che trovavansi nell'interno degli elementi cellulari del tumore originariamente melanotico.

Per controllo volli sottoporre all' azione del permanganato di potassa e acido ossalico, per lo stesso lasso di tempo, delle sezioni di pelle di coniglio a pelame scuro, i cui peli erano ricresciuti neri dopo ripetute iniezioni in loco di composti pirrolici. Ho notato che mentre le parti pigmentate in giallo bruno, come quello della parte esterna della guaina del pelo, subivano in 5'-10' l'azione decolorante dei reagenti adoperati, le parti colorate intensamente in nero, quali il bulbo pilifero e gli scapi del pelo, non mostravano alcuna riduzione della loro intensa pigmentazione.

Rilievo anche messo in evidenza per i pigmenti della coroide di vitello, che si decolorano solo se la soluzione di permanganato si fa agire per lungo tempo. (da mezz'ora a parecchie ore, a seconda l' intensità di colorazione dei granuli di pigmento). È probabile che i neri intensi rappresentino l'ultimo grado del ciclo delle melanine, mentre le granulazioni colorate in giallo, marrone chiaro o brunastro (messi in evidenza nell' interno degli elementi cellulari neoplastici, che si decolorano facilmente con il metodo *Alfieri* e che assumono un colorito verde-smeraldo col bleu di metilene policromo di *Unna*) rappresentino gradi di passaggio necessariamente e successivamente ascendenti per giungere al nero, colore che poi si riscontra intensissimo nella coroidea o in altre melanine naturali; neri, non agevolmente isolabili, nè facilmente solubili.

Intanto, colorando le sopradette sezioni di cute di coniglio a pelame scuro (senza essere stati sottoposti al l' azione del decolorante), ho notato come la parte della guaina del pelo, pigmentata in giallo-brunastro assuma col bleu policromo un colorito verde smeraldo, mentre il bulbo pilifero e gli scapi del pelo rimangono intensamente neri.

Se le sezioni di cute di coniglio a pelame scuro, invece, dopo aver subito, per 5'-10', l'azione del permanganato di potassio e acido ossalico, vengono sottoposte alla colorazione col bleu policromo di *Unna*, si rivela - al posto del color verde smeraldo, precedentemente notato - una colorazione azzurra più o meno intensa. Fatto pure nettamente notato nelle sezioni del nodulo sarcomatoso umano apigmentato e del tumore melanotico dello stesso individuo, decolorato in 5'-10'

col metodo *Alfieri* e dove rimanevano visibili nell' interno degli elementi cellulari (in sezioni tagliate al microtomo congelatore e montate in glicerina) dei vacuoli, colorati molto debolmente in giallo. Tutti questi fatti porterebbero ancor più ad orientarci nel senso, che le granulazioni di colorito giallo o marrone, più o meno brunastro, riscontrate tanto nel nodulo sarcomatoso naturalmente melanotico, quanto in quello reso pigmentato con ripetute iniezioni di pirrolo in loco, rappresentino con probabilità termini di ossidazione di composti pirrolici, tendenti ad aumentare l' intensità della loro colorazione, fino a pervenire al nero, che si riscontra nelle melanine naturali; sostanze intermedie, che somiglierebbero a quelle che l' *Angeli* cita come prodotti secondarî, ottenuti ossidando composti pirrolici per mezzo dell' acido peracetico.

*
* *

I risultati riportati in questa nota ci inducono a credere che il pigmento posto in evidenza nell' interno degli elementi cellulari di tumori melanotici provenga da stati successivi di trasformazione di prodotti pirrolici in circolo (ossidazione probabilmente prodottasi per opera di speciali fermenti) e quindi da stati successivamente più colorati dal giallo al marrone scuro o bruno intenso, giacchè non solo ho potuto seguire microscopicamente nelle sezioni istologiche del tumore questi termini di trasformazione, ma ho visto anche che i prodotti ultimi di queste melanine, a differenza dei suddetti prodotti intermedi, non reagiscono - come questi - al bleu di metilene policromo di *Unna*, nè si decolorano facilmente col metodo *Alfieri*.

Chè per la formazione di tali melanine concorrano dei composti pirrolici sta a dimostrarlo il fatto, che il nodulo metastatico apigmentato si è lestamente caricato di pigmento melanico, dopo iniezioni di pirrolo; che se invece questi fosse rimasto estraneo o inerte, la pigmentazione del nodulo metastatico non sarebbe forse avvenuta o avrebbe seguito la sua normale, progressiva e lenta evoluzione.

Le surriportate ricerche isto-bio-chimiche illustrano con dati di fatto, quanto hanno già stabilito fondamentali studi della Scuola italiana sulle melanine in genere (*Angeli* e *Saccardi* dal lato chimico, *Rondoni* dal lato biologico, *Gallerani* dal lato fisico), facendo rílevare quale e quanta parte importante spetti al nucleo pirrolico anche nella formazione del pigmento dei tumori melanotici.

BIBLIOGRAFIA

Angeli - I neri di pirrolo e le melanine - « Gazzetta chimica italiana, anno XLVI, parte II, fasc. IV, 1916. - « Rendiconti R. Acc. dei Lincei ». Vol. XXIV, 2° semestre, 1915; Vol. XXVII, fasc. 6, 1918; Vol. XXVII serie 5, fasc. 7, 1918.

Angeli e *Alessandri* - « Gazzetta chimica italiana », anno XLVI, parte II, fasc. IV, 1916.

Angeli e *Lutri* - « Rendiconti R. Accad. dei Lincei », Vol. XXIX, serie V. fasc. I-II, 1920.

Angeli e Pieroni – « Rendiconti R. Accad. dei Lincei », Vol. XXVII, fasc. X, 1918; Vol. XXX, serie 5ª fasc. VIII, 1921.

Alfieri – Vedi metodo di decolorazione del pigmento melanico: Fusari - Tecnica-istologica, Un. tip. tor. p. 48, 1909; Schmorl, Tecnica-istologica. p. 150, 1911.

Basile – Sulla composizione e origine dei pigmenti nei melano-sarcomi. Tommasi, N. 30, 1906.

Bêchaux – Contribution à l' étude du sarcome mélanique, Th. de Paris, 1908-09.

Berdez u. Nencky – Ueber die Farbstoffe der melanotischen sarkome. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. Bd. XX.

Bilancioni – Sarcoma melanotico della fossa nasale Tumori, anno VII, fasc. 1, 1921.

Bloch – Zeitschrift f. physik. Chemie. Bd. XCIII, 1917.

id. – Arch. f. dermat. u. Syphilis. Bd. CXXIV, Hf. 2, 1917.

Bonnet – La melanose et les tumeurs melanotiques. Thése de Lyon. 1911, Lyon chirurgical. T. VIII, 1912.

Carbone – Contributo alla conoscenza chimica dei pigmenti dei melanosarcomi. Giornale d. R. Accad. med. di Torino, 1896, N. 7-8.

Cipollone – Sulla struttura di alcuni sarcomi melanotici. Ann. di med. navale, II, 1896.

Dressler – Vierteljahrschrift f. prat. Heilk. Bd. 88, 1865.

Ducceschi – Sulle melanine. Arch. di fisiologia, Vol. I, 1904.

Durham Florence – Proceed. R. Society LXXIV, 1914.

Eppinger – Biochem. Zeitschrift. Bd. XXVIII, 1910.

v. Fuerth – Probleme d. physiolog. u. pathol. Chemie. Leipzig, 1913.

Gallerani – Ricerche spettrofotometriche sul pirrolo e le melanine (Bollett. Soc. Eustachiana di Camerino, 7 dic. 1921).

Gaskill – H. K. Melanotic sarcomas resulting from Irritation of the pigmented nevi. Journ. Amer. Med. Assoc. 1913.

Hava – Zur Kenntnis der Melanome. Virchow's Archiv. Bd. 215, 1914.

Heintz – (rip. da Lo Cascio, pag. 3).

Jäger – Die Entstehung des Melaninfarbstoffes. Wirchow's Archiv. Bd. 198.

Lagrange – Bull. Soc. Anat. et phys. de Bordeaux, 1891.

Licini – Contributo allo studio dei tumori melanotici. Riforma medica N. 24, 1911.

Lo Cascio – Sulla costituzione del pigmento dei sarcomi melanotici della coroide. Roma, tip. Artero, 1915.

Meirowsky – Frankfurter Zeitschrift f. Pathol. Bd. 2, 1909.

id. – Centralblatt f. alleg. Pathol. Bd. XX, 1909.

Mörner – Zeischrift f. phys. Chemie Bd. II, pag. 66.

Neuberg – Festschrift f. Salkowski. Berlin, 1904; Bioch. Zeitschrift Bd. VIII, 1908; Virchow's. Archiv. Bd. 192, 1908.

Nevpeau - Mémoires de la Societé de biolog. T. XXIV, 1872.
Pereyra - Contributo allo studio dei melano-sarcomi epibulbari. Annali di ottalmologia, fasc. 11-12, 1913.
Pighini - Sul comportamento del pirrolo nell' organismo animale. Archivio di fisiologia, Vol. III, fasc. I, 1905.
Primavera - Contributo allo studio del pigmento dei melano-sarcomi. Giorn. intern. delle scienze mediche, fasc. 20, 1907.
Razzaboni - Sarcoma melanotico primitivo del masc. sup. Lo Sperimentale, fasc. V, 1915.
Ravenna - Beiträge z. Histogenese der melanotischen Geschwülste. Virchow's Archiv. Bd. 171, 1903.
Ribbert - Ueber das Melanosarcom. Ziegler's Beitrag. Bd. XXI, 1897.
Rondoni - Sull' origine delle melanine dal pirrolo. Lo Sperimentale, Fasc. IV-VI 1920. Fasc. I-III 1921; Riforma Medica, N. 35, 1921.
Rössle - Pigmentierungsorgang in Melanosarkom. Zeitschr. f. Krebsforschung. Bd. II, 1904.
Saccardi - Pirrolo e melanuria. Nota I in «Rendic. R. Accad. dei Lincei» XXVIII, 1, 1919; Nota II, «ibid.» XXVIII, 2, 1919; Nota III «Gazzetta Chim. ital.» II, 3; Nota IV «ibid.» 1921; Nota V, «Rend. R. Accad. dei Lincei e Boll. Soc. Eustachiana di Camerino» XIX, N. 1, 1921. Nota VI, «Ren. R. Accad. dei Lincei», 1921; Nota VII «Boll. Soc. Eustachiana di Camerino», N. II 1921; Nota VIII «Boll. Soc. Eustachiana di Camerino», N. III 1921.
Salkowski - Virchow's, Arch. Bd. 227, 1920; Bd. 228, 1920.
Samuely - Hofmeister's Beitr. Bd. II, 1902 e il cap. Tierische Pigmente nell' «Hand *d.* bioch. Arbeitsmethoden» di Abderhalden.
Schmiedeberg - (citato da Bilancioni pag. 31).
Unna - (vedi proc. tecn. per la coloraz. dei pigmenti ematici e per le melanine: Schmorl. metodi di esame delle ricerche istopatolog.). Unione tip. Torinese 1911, pag. 150.
Stein - Ueber die Pigmentierung der melanotischen Geschwülste. Wien. Med. Wochenschrift, 1913.
Valerio - Ricerche istologiche su tre casi di melanosarcomatosi. Giorn. med. del R. Esercito, 1905.
Vallillo - Ricerche chimiche su un sarcoma melanotico. Sperimentale, 1909.

